Das Polysaccharid-Spektrum des Flußkrebses Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute Herz-Hübner
aus Berlin

1971

Das Polysaccharid-Spektrum des Flußkrebses Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute Herz-Hübner
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. K. Urich

2. Referent: Prof. Dr. W. Knülle

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1971

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Urich am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die stete Beratung und großzügige Förderung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. Urich zu größtem Dank verpflichtet. Mein Dank gilt gleichfalls für die eingehende Kritik bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methodik	2
2.1	Tiermaterial	2
2.2	Präparation und Extraktion	2
2.3	Bestimmung des Polysaccharidgehalts	4
2.4	Proteinbestimmung	4
2.5	Fraktionierung der Polysaccharide	4
2.5.1	Bariumhydroxidfällung	4
2.5.2	Fraktionierte Alkoholfällung	5
2.5.3	Chromatographie an Ionenaustauschern (DEAE- und Ecteola-Cellulose)	5
2.5.4	Elektrophorese auf Dünnschichtplatten	6
2.6	Bausteinanalyse	7
2.6.1	Hydrolyse	7
2.6.2	Bausteinbestimmung	7
2.6.2.1	Dünnschichtchromatographie	7
2.6.2.2	Reaktionen zur quantitativen Bausteinbestimmung	8
3.	Ergebnisse	14
3.1	Ergebnisse der Trennungsschritte	15
3.2	Ergebnisse der Bausteinanalyse	16
3.3	Molekulargewichtsbestimmung	19
4.	Diskussion	20
4.1	Vergleichende Betrachtung	20
4.2	Funktionelle Betrachtung	23
4.2.1	Homoglykane als Speicher- und energieliefernde Substanz	23
4.2.2	Funktion der Heteropolysaccharide	25
4.2.2.1	Strukturbestandteile	25
4.2.2.2	Teile von Glykoproteiden	25
4.2.3	Chitinsynthese	26
5.	Offene Fragen	27
6.	Zusammenfassung	28
7.	Literaturverzeichnis	29

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0072

1. Einleitung

Die in üblicher Weise durch Extraktion und Alkoholfällung aus wirbellosen Tieren isolierten Polysaccharide wurden in der Literatur gewöhnlich als "Glykogen" bezeichnet. Dabei dürfte es sich jedoch meistens um Gemische verschiedener Polysaccharide handeln, von denen das Glykogen S. str. nur einen - unter Umständen geringen Teil ausmacht. Nur eine geringe Zahl von Untersuchungen an Wirbellosen bemühte sich um die Fraktionierung verschiedener Polysaccharide, beschränkte sich aber auf jeweils wenige Methoden der Trennung. Demzufolge erhielt man nicht mehr als zwei bis drei verschiedene Fraktionen, deren eine meistens aus Glykogen bestand.

Bei ihren Experimenten an Crustaceen isolierten Hu (1958) sowie Meenakshi und Scheer (1959) aus Hemigrapsus nudus und Dall (1965[c]) aus Metapenaeus außer Glykogen ein weiteres Polysaccharid, als dessen Bausteine sie Glucose, Galaktose und Fucose identifizierten und quantitativ bestimmten. In späteren Untersuchungen an Orconectes limosus (Speck, 1967) wurden sieben unterschiedliche Bausteine (Glucose, Galaktose, Fucose, Mannose, Glucosamin und Hexuronsäuren) in der alkoholfällbaren Polysaccharidfraktion gefunden. Auf Grund dieser Mannigfaltigkeit ließ sich vermuten, daß es sich hier um mehrere Polysaccharide handeln mußte.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, die vermutlich zahlreichen Polysaccharide aus Orconectes limosus zu isolieren und als ersten Schritt zur Charakterisierung der reinen Substanzen Bausteinanalysen durchzuführen. Hierzu mußte ein Trennungsgang vorher entwickelt werden.

2. Material und Methodik

2.1 Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten im November 1969 frischgefangene, männliche und weibliche Flußkrebse der Art Orconectes limosus Rafinesque (= Cambarus affinis Say) aus der Havel bei Berlin-Spandau. Sie wurden nicht länger als drei Tage unter fließendem Leitungswasser bei etwa 13° C gehältert und ausreichend mit Herzfleisch gefüttert.

2.2 Präparation und Extraktion

Die Tiere wurden durch Einfrieren in einer Tiefkühltruhe bei minus 18° getötet. Nach 30 Minuten wurden Mitteldarmdrüse, Kiemen, Herz, Integumentgewebe und Schwanzmuskel herauspräpariert, auf Filtrierpapier abgetupft, in vorgewogenen Bechergläsern, gekühlt in Eis-Alkoholmischung, gesammelt, gewogen und in einem Volumen kaltem destilliertem Wasser homogenisiert. Durch dieses Extraktionsverfahren sollten Veränderungen der Polysaccharide, wie sie bei Behandlungen mit heißem Alkali auftreten (Orrell und Bueding, 1964), vermieden werden. Enzymatischer Abbau der Polysaccharide ist auch bei Kaltwasserextraktion wenig wahrscheinlich; dies bestätigen Untersuchungen von Schwabe et al. (1952), die bei toten Palinurus selbst nach einer Stunde bei 30° keine meßbaren Werte einer Glykogenolyse nachweisen konnten.

Das Organhomogenat wurde bei 4° 30 min zentrifugiert und der Überstand mit 4 Volumen vergälltem Alkohol versetzt. Hierbei fiel der Polysaccharideiweißkomplex aus, der 24 h bei 4° stehenblieb und dann abzentrifugiert wurde. Das Sediment wurde durch 2 h Rühren in 5-10 Volumina KCl-Lösung gelöst, die Lösung mit 4 Volumina Alkohol versetzt und 24 h bei 4° stehengelassen. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert, das Sediment in 5 Teilen 0.1 M Tris/HCl Puffer pH 8 gelöst, pro Gramm Eiweiß 30 mg Trypsin zugegeben und bei 37° 4 h incubiert, um das Eiweiß des Polysaccharid-Komplexes weitgehend abzubauen. Das Eiweiß wurde mit 2 % Perchlorsäurelösung ausgefällt und abzentrifugiert, der neutralisierte Überstand mit 4 Teilen

vergälltem Alkohol versetzt. Das ausgefallene Polysaccharid wurde abzentrifugiert und in Wasser gelöst. Der so erhaltene Polysaccharidextrakt diente als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen.

Um die bei der Kaltwasserextraktion verlorengegangenen Polysaccharide quantitativ zu erfassen, wurde der Rückstand der Organhomogenate in einem Volumen 2n Kaliumhydroxidlösung 30 min bei 100° erhitzt, abzentrifugiert und wie der Überstand der Organhomogenate weiter behandelt.

Z.B.

Tabelle 1 : Polysaccharid-Ausbeute [mg Glucoseäquivalent bei Kaltwasserextraktion und anschließender Extraktion mit heißer KOH. Bestimmung mit Anthron.

Organ	Frischgewicht [g]	Polysaccharid-Ausbeute [mg] Kaltwasser	KOH
Mitteldarmdrüse	275	562	9
Kiemen	245	39	6
Herz	23	130	8
Integumentgewebe	67	35	3
Schwanzmuskel	955	40	10

Wie Tabelle 1 zeigt, ist der Verlust an Polysaccharidmenge bei der Kaltwasserextraktionsmethode für die Organe Mitteldarmdrüse, Herz und Integumentgewebe nicht größer als 10 %. Um die Polysaccharide in "nativer" Form zu gewinnen, kann diese relativ geringe Verlustrate hingenommen werden.

Sämtliche Chemikalien und Reagenzien waren von p.a.-Qualität und wurden, soweit nicht besonders vermerkt, von der Firma E. Merck A.-G., Darmstadt, bezogen.

2.3 Bestimmung des Polysaccharidgehalts

Der Polysaccharidgehalt wurde nach zwei Methoden bestimmt: Einmal mit der relativ unspezifischen Reduktionsmethode nach Brearley und Weiss (1968) (Endvolumen 1.5 ml, gemessen bei 412 nm), die nur bei hydrolysierten Proben anwendbar ist und folgende reduzierende Zucker erfaßt: Aminozucker, Hexuronsäuren, Neutralzucker und N-Acetylneuraminsäure. Die Anthron-Methode nach Roe (1955) (Endvolumen 1.5 ml, 10 min bei 100°, gemessen bei 620 nm) erfaßt nur neutrale Hexosen, von denen Glucose und Galaktose ähnliche Extinktionswerte, Fucose jedoch einen 50 % niedrigeren Wert ergeben. Die Berechnung der Zuckermengen erfolgte in beiden Fällen in Glucoseäquivalenten.

2.4 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) mit dem Reagenz nach Folin - Ciocalteau bestimmt. Aus einer für kristallines Rinderserumalbumin aufgestellten Eichkurve wurden die der Extinktion bei 750 nm entsprechenden Proteinmengen abgelesen.

2.5 Fraktionierung der Polysaccharide

Die Polysaccharide wurden mit Hilfe eines Trennungsganges fraktioniert, in dem folgende Methoden nacheinander angewandt wurden:

Fällung mit Bariumhydroxid
Fraktionierte Alkoholfällung
Chromatographische Trennung an DEAE-Cellulose
" " an Ecteola-Cellulose

Sämtliche Schritte des Trennungsganges wurden in Vorversuchen am Gesamthomogenat des Flußkrebses durchgeführt.

2.5.1 Bariumhydroxidfällung

Es ist weitverbreitet, Polysaccharide zu fraktionieren und zu reinigen, indem man sie in unlösliche Metallkomplexe überführt. Nach Meier (1958) sollen Polysaccharide, die ß (1 – 4) gebundene D-Mannose bzw. Galaktose enthalten, mit Bariumhydroxid-

lösung ausfallen. Die Polysaccharidlösung der einzelnen Organe mit einer Konzentration von 2 mg/ml wurde mit gesättigter Bariumhydroxidlösung vollständig gefällt und zentrifugiert, der Rückstand in 2n Essigsäure gelöst.

2.5.2 Fraktionierte Alkoholfällung

An den Fraktionen der Bariumhydroxidfällung wurde die Alkoholfällung bei 43 %, 54 % und 80 % Alkohol durchgeführt. Die Prozentwerte ergaben sich daraus, daß die Alkoholkonzentration jeweils so lange erhöht wurde, bis ein abzentrifugierbarer Niederschlag entstand. Die Sedimente wurden 2 h bei 4° stehen gelassen und dann abzentrifugiert.

2.5.3 Chromatographie an Ionenaustauschern (DEAE- und Ecteola-Cellulose)

Basische Cellulosederivate (Celluloseanionenaustauscher) lassen sich auf Grund ihrer großen Oberfläche zur chromatographischen Fraktionierung von Polysaccharidgemischen verwenden. Die Versuche wurden mit DEAE-Cellulose (Diäthylaminoäthylcellulose-SH) der Firma Serva-Heidelberg nach Neukom et al. (1960) durchgeführt. Da die verschiedenen Polysaccharide bei unterschiedlichen pH-Werten und Elektrolytkonzentrationen nicht gleichstark haften, kann man durch geeignete Elutionsmittel eine Fraktionierung erzielen. Das Gel wurde mit 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 6.1 äquilibriert. Polysaccharide in einer Konzentration von 20 mg/ml wurden im Verhältnis 40 mg/g trokkene DEAE-Cellulose auf eine Säule mit der Abmessung 16 cm/2 cm (Länge/Durchmesser) gegeben.

Zunächst wurde stufenweise mit 0.025 M und 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 6.1 eluiert, anschließend mit einem linearen Gradienten von 0.01 - 0.3 M Natriumhydroxidlösung. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Eluate wurden in 4 ml-Fraktionen aufgefangen.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Fraktionen des Peakmaximums verwendet, dessen Einheitlichkeit als wahrscheinlich angenommen werden konnte. Sie wurden gegen Wasser dialysiert, in Vakuum eingedampft und in Wasser gelöst.

Für die fraktionierende Wirkung der Ecteola-Cellulose werden verschiedene Begründungen angegeben. Nach Laurent (1961) werden Polysaccharide auf Grund des Molekulargewichtes an Ecteola-Cellulose getrennt, nach Wortmann (1962) jedoch wegen ihrer unterschiedlichen Sulfatgehalte. Die Versuche wurden mit Ecteola-Cellulose der Firma Serva/Heidelberg nach Ringertz und Reichard (1960) durchgeführt. Das nach Rybak et al. (1966) gewaschene und mit 0.1 n Natriumchlorid-Salzsäurelösung im Verhältnis 1:1 äquilibrierte Gel wurde in eine Säule mit der Abmessung 10 cm/1 cm (Länge/Durchmesser) gefüllt. Eine Polysaccharidlösung von 2 mg/ml wurde aufgegeben und mit einem linearen Gradienten von 0.01 - 0.3 M NaCl - HCl (1:1) pH 1.3 eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h. Die Eluate wurden in 2 ml-Fraktionen aufgefangen. Auch hier wurden die Fraktionen weiter verarbeitet, deren Einheitlichkeit als wahrscheinlich angenommen werden konnte. Sie wurden gegen Wasser dialysiert, in Vakuum eingedampft und in Wasser gelöst.

2.5.4 Elektrophorese auf Dünnschichtplatten

Die Reinheit der verschiedenen Fraktionen wurde durch Elektrophorese auf Kieselgelplatten nachgewiesen. Im Gegensatz zu dem für Polysaccharidtrennungen häufig verwendeten Papier haben Kieselgelschichten den Vorteil, einerseits gegen aggressivere Sprühreagenzien inert zu sein, andererseits schärfer voneinander getrennte Banden zu liefern.

Die Trennungen wurden mit dem "Elphor"-Gerät der Firma Bender & Hobein durchgeführt. Die Glasplatten (20 x 20 cm) wurden in der üblichen Weise nach Stahl (1967) mit Hilfe eines Streichgerätes (Firma Desaga/Heidelberg) mit Kieselgel G beschichtet und getrocknet. Die Polysaccharidfraktionen wurden in der Konzentration von 200 µg/20 µl in der Mitte der Kieselgelplatte mit einer Mikropipette als feiner Strich aufgetragen. Die Platte wurde mit 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 6.9 besprüht. Pufferkammer und Kieselgelplatte wurden mit Filtrierpapierstreifen verbunden. Ein optimales Ergebnis wurde in 2 h bei 400 V mit 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 6.9 erzielt. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine maximale Bandenzahl bei ausreichender Trennschärfe.

Um die einzelnen Banden sichtbar zu machen, wurden die Kieselgelplatten mit Anilin - Diphenylamin - Phosphorsäure besprüht (Stahl, 1962) und bei 80° 30 min getrocknet.

2.6 Bausteinanalyse

2.6.1 Hydrolyse

Die Polysaccharide wurden nach Haab und Anastassiadis (1961) an Ionenaustauschern hydrolysiert, da bei saurer Hydrolyse zu viele Artefakte auftreten können.
Der Wiederfund bei käuflichen Monosacchariden betrug nach 12 h Hydrolyse an Ionenaustauschern für Neutralzucker 100 %, Hexosamine 85 % und Hexuronsäuren 52 %.

Jeweils 1 mg Polysaccharid wurde in 0.5 ml dest. Wasser gelöst, mit 150 mg Kationenaustauscher I der Firma Merck/Darmstadt versetzt und 12 h bei 105° inkubiert. Die in Wasser gelösten Neutralzucker und Hexuronsäuren wurden abgesaugt und der Austauscher 2 x mit 300 µl Wasser gespült. Um die Aminozucker vom Ionenaustauscher zu lösen, wurde dieser mit 3 x 300 µl 5n Ammoniak eluiert; alle Proben wurden in Vakuum eingedampft.

2.6.2 Bausteinbestimmung

2.6.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Bausteinzusammensetzung wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt. Zur Fraktionierung der Hydrolysate nach Günther und Schweiger (1968) dienten 200 µ dicke Celluloseschichten, die mit dem Laufmittel Pyridin-Isopropanol - H_2O - Essigsäure (8:8:1:4) vorgewaschen wurden, das auch zur Chromatographie verwendet wurde. Die jeweils punktförmig aufgetragene Probe enthielt ca. 50 µ g Zucker. Neutralzucker und Hexuronsäuren wurden mit Anisidin - Phthalat (Stahl, 1962) angefärbt, Glucosamin und Galaktosamin dagegen mit Ninhydrin - Butanol - Reagenz (Stahl, 1962), wobei auch die Aminosäuren sichtbar werden.

2.6.2.2 Reaktionen zur quantitativen Bausteinbestimmung

Glucose und Galaktose ließen sich direkt messen. Glucose wurde enzymatisch mit Glucoseoxydase und Galaktose mit Galaktosedehydrogenase der Firma Boehringer (Endvolumen 830 µl) im UV-Test gemessen.

Bestimmung mit Hexokinase nach Finch et al. (1969) (Endvolumen 960 µl, gemessen bei 340 nm) erfaßt Glucosamin, Mannose und Glucose. Glucosamin blieb bei der Hydrolyse am Ionenaustauscher haften und befand sich nicht in der Lösung. Der Mannosegehalt ließ sich errechnen, indem der mit Glucoseoxydase ermittelte Glucoseanteil von dem Wert der Hexokinasebestimmung abgezogen wurde.

Hexuronsäure wurde nach Stary und Yuvanidis (1953) mit der Naphthoresorcinreaktion bestimmt (Endvolumen 2 ml, Messung bei 580 nm).

Nach der Methode von Brearley und Weiss (1969) ließ sich Fucose von anderen Monosacchariden unterscheiden, da ihr Adsorptionsmaximum im Gegensatz zu dem der übrigen Zuckerkomponenten nicht bei 412, sondern bei 390 nm liegt. Zur Berechnung des Fucoseanteils am Gesamtgemisch mußte also die Menge der übrigen Komponenten bekannt sein.

Hexosamin wurde nach Elson und Morgan (1933) bestimmt (Endvolumen 2.5 ml, Messung bei 530 nm).

Glucosamin wurde nach Finch et al. (1969) ermittelt. Da sich für Galaktosamin bei dieser Methode keine nennenswerten Extinktionswerte ergaben, wurde sein Gehalt aus der Differenz zwischen Hexosaminmenge und der des Glucosamins ermittelt.

Sulfat wurde kolorimetrisch bestimmt mit der Bariumchloranilatmethode nach Bertolacini und Barney (1957) in der Mikromodifikation von Spencer (1960).

Im allgemeinen Nachweis der Sialinsäuren diente die Bialsche Reaktion nach Werner und Odin (1952), die etwas verändert übernommen wurde (1 ml Probe und 1 ml Bial-Reagenz wurden 5 min bei 142° erhitzt, abgekühlt und bei 570 nm gemessen).

Tabelle 2

Die Auftrennung der Polysaccharide aus den Organen Mitteldarmdrüse, Kiemen, Herz, Integumentgewebe und Schwanzmuskel in die einzelnen Fraktionen.

Erklärung zu den Ziffern der Spalte 1 :

1. Ziffer: $Ba(OH)_2$-Fällung 1 = Überstand 2 = Sediment.
2. " : Alkoholfällung 1 Niederschlag bei 43 %, 2 bei 54 % und 3 bei 80 %.
3. " : Trennung an DEAE-Cellulose 1 = 1. Peak, 2 = 2. Peak etc.
4. " : Trennung an Ecteola-Cellulose 1 = 1. Peak, 2 = 2. Peak etc.

Spalte 3 erfaßt folgende reduzierende Zucker: Aminozucker, Hexuronsäuren, N-Acetylneuraminsäure und neutrale Hexosen.

Mitteldarmdrüse	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker / neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	Zahl der Banden des Elektropherogramms
Gesamt	562	-	-	4
1.	330	-	-	3
1.1	75	-	-	3
1.1.1	13	20	1.5	2
1.1.1.1	7.7	7.7	1.0	1
1.1.1.2	5.3	11	2	1
1.1.2	7.7	15	1.9	1
1.1.2.1	2.4	5.7	2.4	1
1.1.3	8.3	15	1.8	2
1.1.3.1	2.0	3.5	1.8	2
1.1.3.2	1.5	2.8	1.9	2
1.1.4	?	24	-	1
1.1.4.1	1.2	2.1	1.8	1
1.1.4.2	1.6	4.0	2.5	1
1.1.5	?	5.1	-	1
1.1.6	20	30	1.5	1
1.2	12	20	1.6	3

(Fortsetzung)

(Mitteldarmdrüse)	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker / neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	Zahl der Banden des Elektropherogramms
1.3	159	-	-	3
1.3.1	26	40	1.5	1
1.3.1.1	24	37	1.5	1
1.3.2	-	4.8	-	2
1.3.2.1		0.7	-	-
1.3.2.2	-	2.4	-	2
1.3.2.3	-	0.9	-	2
1.3.3	16	25	1.6	2
1.3.3.1	6.5	9.7	1.5	1
1.3.3.2	3.7	3.8	1.0	1
1.3.4	10	16	1.6	2
1.3.4.1	3.6	5.8	1.6	1
1.3.4.2	2.6	2.7	1.0	1
1.3.4.3	2.5	4.1	1.6	1
1.3.5	6.6	13	2.0	2
1.3.5.1	2.5	3.6	1.4	1
1.3.5.2	2.5	2.7	1.0	1
1.3.6	28	40	1.4	2
1.3.6.1	6.0	18	3.0	2
1.3.6.2	2.3	5.2	2.3	2
1.3.6.3	7.2	14	1.9	2
2.	75			2
2.1	7.1	14	1.9	3
2.1.1	0.7	1.3	1.9	1
2.1.2	1.1	2.1	1.9	2
2.1.3	2.3	4.2	1.8	1
2.2	4.1	4.6	1.4	4
2.3	42	72	1.7	2
2.3.1	5.7	7.8		1
2.3.1.1	2.6	2.7	1.0	1
2.3.2	7.2	14	1.9	2
2.3.2.1	5,4	6,3	1.2	1
2.3.2.2	1.7	2.8	1.6	2
2.3.3	2.6	5.4	2.1	2

(Fortsetzung)

Kiemen	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker / neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	Zahl der Banden des Elektropherogramms
Gesamt	39			4
1.	22			3
1.1	14	25	1.8	-
1.1.1	7.3	12	1.6	2
1.1.1.1	1.8	2.9	1.6	1
1.1.1.2	3.8	5.2	1.5	1
1.1.2	2.8	5.9	2.1	2
1.1.3	1	3.4	3.0	3
1.1.4	-	1.1	-	3
1.2	1.1	2.5	2.3	
1.3	7.6	12	1.6	
1.3.1	4.9	4.9	1.0	
1.3.2	0.1	2.7	2.6	2
1.3.3	3.5	5.1	1.5	2
1.3.4	-	0.1	-	-
1.3.5	-	0.1	-	-
2.	3.1			2
2.1	0.8	1.6	2.0	
2.2	1.0	1.9	1.9	-
2.3	0.8	1.7	2.1	
Herz				
Gesamt	130	-	-	1
1.	70			
1.1	4.7	6.1	1.3	-
1.2	-	-	-	-
1.3	58	60	1.0	1
1.3.1	56	56	1.0	1
1.3.1.1	38	38	1.0	1

(Fortsetzung)

(Herz)	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker / neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	Zahl der Banden des Elektropherogramms
1.3.2	-	1.9	-	3
2.	3.2	-	-	
2.1	0.7	1.9	2.7	-
2.3	2.5	2.6	1.0	-
Integumentgewebe				
Gesamt	35			3
1.	22			3
1.1	0.7	1.2	1.7	-
1.2	-	-	-	-
1.3	6.4	9.0	1.4	-
1.3.1	2.9	2.8	1.0	3
1.3.2	-	1.3	-	2
1.3.3	1.4	2.0	1.4	3
1.3.4	0.3	1.2	4.0	1
2.	1.1			2
2.1	0.4	0.5	1.3	-
2.3	0.6	1.7	2.8	-
Schwanzmuskel				
Gesamt	40			4
1.	18.2			3
1.1	2.4	4.1	1.7	-
1.2	1.6	4.6	2.9	-
1.3	8.0			

(Fortsetzung)

(Schwanzmuskel)	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker / neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	Zahl der Banden des Elektropherogramms
2.	4.8			2
2.1	1.9	5.9	3.1	-
2.2	0.6	1.8	3.0	-
2.3	1.2	3.9	3.3	-

3. Ergebnisse

Das Polysaccharidspektrum vom Orconectes limosus ist unerwartet komplex (vgl. Tabelle 2). Von besonderer Vielfalt erweist sich dabei das Spektrum der Mitteldarmdrüse mit 31 Endfraktionen, wobei sogar noch eine Reihe mengenmäßig unbedeutender Fraktionen unberücksichtigt blieb. 19 von den 31 Fraktionen zeigten in dem Elektropherogramm nur eine Bande. Bei den Kiemen ergaben sich 14, darunter 3 elektrophoretisch reine Fraktionen. Für das Herz ließen sich 5 Fraktionen erzielen, von denen die einzige elektrophoretisch reine das Hauptpolysaccharid "Glykogen" bildet.

Um das Ausgangsmaterial zu erhalten, wurden von 770 Krebsen beiderlei Geschlechts die Organe Mitteldarmdrüse, Kiemen, Herz, Integumentgewebe und Schwanzmuskel herauspräpariert und jeweils die Polysaccharide aus den Geweben extrahiert.

Im Vergleich zu dem Tiermaterial anderer Jahre zeichneten sich die untersuchten Krebse durch einen äußerst geringen Polysaccharidgehalt aus. So betragen die in Tabelle 1 aufgeführten Polysaccharidmengen für Mitteldarmdrüse 1/5, Herz und Integumentgewebe je 1/10, Kiemen 1/20 und für Schwanzmuskel sogar nur 1/45 der Werte von Novembertieren aus dem Jahre 1965 (Speck, 1967). Vielleicht ist dieser ausgesprochen niedrige Kohlenhydratgehalt auf den frühzeitig kalten Winter zurückzuführen. Die Ausbeute an Kohlenhydrat für Kiemen, Integumentgewebe und Schwanzmuskel war so gering, daß für diese Organe nicht alle Schritte des Trennungsganges durchgeführt werden konnten.

Tabelle 2 gibt die ganze Information über die einzelnen Schritte des Trennungsganges und die durch ihn ermittelten Werte an. Die in Spalte 2 und 3 aufgeführten Werte geben eine ungefähre Übersicht über die Anteile der Polysaccharide am Gesamtspektrum. Die dabei auftretenden Verlustraten haben zwei Ursachen. Einmal ergibt sich ein Verlust an Polysacchariden durch unvollkommene $Ba(OH)_2$- und Alkoholfällung. Zum anderen bedeutet das Verfahren, bei der DEAE-Fraktionierung nur die Peakmitte der

größeren Fraktion weiter zu verarbeiten, daß einige Polysaccharidarten ganz, andere nur zu einem Teil verloren gingen.

3.1 Ergebnisse der Trennungsschritte

Die Polysaccharide der einzelnen Organe zeigten bereits in den ersten beiden Schritten des Trennungsganges, $Ba(OH)_2$- und Alkoholfällung, beträchtliche Unterschiede. So fielen mit $Ba(OH)_2$ bei der Mitteldarmdrüse 19 %, 14 % beim Schwanzmuskel, 12 % bei den Kiemen und 5 % bei Herz und Integumentgewebe aus. Alkoholfraktionierung der $Ba(OH)_2$-Überstände ergab 3 Gruppen von Organen. Bei den Kiemen fielen 2/3 schon bei 43 %, 1/3 erst bei 80 % Alkoholendkonzentration aus. Die zweite Gruppe, gebildet von Mitteldarmdrüse und Schwanzmuskel, war dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Alkoholendkonzentration von 43 % 1/3 und bei 80 % 2/3 des Polysaccharids ausfielen. Bei Herz und Integumentgewebe als dritter Gruppe fielen erst bei 80 % Alkoholendkonzentration wesentliche Polysaccharidmengen aus.

Bei der Alkoholfällung der $Ba(OH)_2$-Sedimente ließ sich eine ähnliche Systematik aufstellen.

Die Fraktionierung mit DEAE-Cellulose erwies sich als Verfahren mit großer Trennschärfe, wobei z.B. die Mitteldarmdrüse 19 größere Fraktionen ergab.

Für einige Fraktionen bot die Fraktionierung mit Hilfe der Ecteola-Cellulose zusätzliche Trennungsmöglichkeiten (so für Midd. 1.1.1, Midd. 1.3.3, Midd. 2.3.2 und Kie. 1.1.1, aber nicht für Midd. 1.3.6, Midd. 1.1.3 und Midd. 1.1.2).

Es stellt sich die Frage, ob die Methoden des Trennungsganges in der Lage sind, die Polysaccharide eines Organs quantitativ zu trennen, oder ob sich etwa bei $Ba(OH)_2$- und Alkoholfraktionierung in Über- und Rückstand identische Fraktionen finden lassen bzw. bei der DEAE-Fraktionierung die Ausgangsmenge wieder gefunden wird. Diese Frage muß bejaht werden, da im Verhältnis zur Vielzahl der ermittelten Fraktionen nur ein verschwindend geringer Teil nicht quantitativ getrennt wurde. Dabei entspricht die Fraktion Midd. 1.1.3 derjenigen von

Midd. 1.3.3, sowie die Fraktion Midd. 1.3.5 derjenigen von Midd. 2.3.3. Die Fraktionen gleichen sich jeweils in dem Elutionsvolumen in der DEAE-Fraktionierung, in dem Verhältnis gesamte reduzierende Zucker/neutrale Hexosen sowie im Elektropherogramm.

Vergleicht man die Fraktionen der verschiedenen Organe, so lassen sich Ähnlichkeiten für Fraktionen der Kiemen und des Integuments finden. So stellt man bei einem Vergleich des Chromatogramms der DEAE-Cellulose der Fraktion Kiemen 1.3 mit dem des Integuments 1.3 fest, daß es sich bei den in beiden Chromatogrammen vorkommenden 4 Hauptfraktionen in drei Fällen um dieselben Fraktionen handelt (Intg. 1.3.1 - Kie. 1.3.1, Intg. 1.3.3 - Kie. 1.3.3 und Intg. 1.3.4 - Kie. 1.3.5). Im Integumentgewebe stellt die Fraktion 1.3 4/5 der Gesamtpolysaccharidmenge dar, in den Kiemen jedoch nur 1/3. An Hand der Fraktionen Integumentgewebe 1.3 und Kiemen 1.3 läßt sich ersehen, daß das Gesamtpolysaccharidspektrum der Kiemen wesentlich komplexer ist als das des Integumentgewebes.

3.2 Ergebnisse der Bausteinanalyse

Die Bausteine der einzelnen Polysaccharide wurden bestimmt für 15 der 19 elektrophoretisch reinen und für 4 der übrigen Mitteldarmdrüsefraktionen, für 2 reine und 1 zweibandige Fraktion der Kiemen, sowie für die einzige reine Fraktion des Herzens.

Als Bausteine der Polysaccharide wurden 9 Substanzen dünnschichtchromatographisch identifiziert (vgl. Tab. 3): Glucose, Galaktose, Mannose, Fucose, Glucosamin, Galaktosamin, Glucuronsäure, Galakturonsäure und Sialinsäure. 7 Substanzen wurden quantitativ bestimmt. Glucuronsäure und Galakturonsäure wurden in der quantitativen Bestimmung als Hexuronsäure zusammengefaßt.

Im Dünnschichtchromatogramm ergab der unbekannte Baustein der Fraktion Mitteldarmdrüse 1.1.5 einen Rf-Wert, der sich von dem der Glucuronsäure und des Glucosamins deutlich unterschied. Dabei zeigte er eine Anfärbung sowohl mit dem spezifischen

Tabelle 3

Die Bausteinzusammensetzung der einzelnen Polysaccharide.

Spalte 3 erfaßt folgende reduzierende Zucker: Aminozucker, Hexuronsäuren, N-Acetylneuraminsäure und neutrale Hexosen.

Die Angabe der Einzelbestimmung erfolgt in Mol-%.

Nachgewiesene Glucuronsäure und Galakturonsäure werden mit " + ", nicht nachgewiesene mit " 0 " bezeichnet.

Mitteldarmdrüse	neutrale Hexosen [mg Glucoseäquivalente]	reduzierende Zucker	Glucose	Galaktose	Mannose	Fucose	Galaktosamin	Glucosamin	Hexuronsäure	Mol-% SO_4 / Mol-% reduzierd. Zucker	Glucuronsäure	Galakturonsäure	Zahl der Banden
1.1.1.1	8	8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1.1.2.1	3	9	4	11	0	49	14	22	0	0	0	0	1
1.1.4.1	1	3	2	9	0	83	6	0	0	0	0	0	1
1.1.4.2	2	6	0	6	0	90	4	0	0	0	0	0	1
1.1.5	?	10	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	1
1.1.6	15	35	0	27	0	23	48	3	0	0	0	0	1
1.3.1.1	24	64	4	16	0	48	19	13	0	0	0	0	1
2.3.3	3	7	1	14	0	62	14	9	0	69	0	0	2
1.3.4.1	4	9	0	32	1	9	19	21	18	0	+	+	1
1.3.4.3	3	7	1	23	0	31	15	22	8	0	+	+	1
1.3.5.1	3	7	0	24	1	45	6	16	9	0	+	+	1
1.3.6.1	6	22	0	17	0	46	13	17	6	0	0	+	2
1.3.6.2	2	7	0	12	0	38	32	18	0	0	0	0	2
1.3.6.3	7	19	0	15	0	16	46	19	4	8	0	+	2
2.1.1	1	3	6	19	0	25	23	27	0	0	0	0	1
2.1.3	1	3	1	12	0	16	33	16	22	0	+	+	1
2.1.2	2	6	0	14	0	18	49	19	0	0	0	0	1
2.3.2.1	7	18	0	23	0	21	32	16	8	0	+	+	1
1.3.3.1	7	14	3	13	4	18	32	31	0	0	0	0	1
Kiemen													
1.1.1.1	2	4	27	8	4	45	8	8	0	0	0	0	1
1.1.1.2	4	10	9	16	0	8	47	20	0	13	0	0	1
1.1.2	3	9	6	3	0	66	18	8	0	13	0	0	2
Herz													
1.3.1	38	38	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Reagenz auf Neutralzucker und Hexuronsäuren, Anisidin-Phthalat, als auch mit dem Reagenz auf Aminogruppen, Ninhydrin - Butanol. Ebenso blieb er am Anionenaustauscher Dowex Typ 21 K der Firma Serva/Heidelberg haften und konnte erst mit 2n HCl wieder abgelöst werden. Es muß sich daher um einen Baustein, der sowohl eine Amino- als auch Säuregruppe besitzt, vermutlich um eine Sialinsäure, handeln. Diese Vermutung wurde bestätigt durch Parallelversuche an gekaufter N-Acetylneuraminsäure der Firma Boehringer/Mannheim, die nach Hydrolyse am Ionenaustauscher den gleichen Rf-Wert wie der fragliche Baustein ergab. Eine weitere Bestätigung der Vermutung ist darin zu sehen, daß Midd. 1.1.5 mit dem Enzym Neuraminidase der Firma Boehringer/Mannheim in Oligomere gespalten wurde.

Um das Polysaccharid Mitteldarmdrüse 1.1.5 in seine Bausteine zu zerlegen, wurden verschiedene Hydrolysemethoden (mit 5n HCl, 0,1 n H_2SO_4 und Kationenaustauscher Merck I) und enzymatischer Abbau angewandt. Die Untersuchungen der verschiedenen Hydrolysate mit spezifischen Methoden auf Sialinsäuren hin verliefen negativ. Der Grund dafür könnte sein, daß unter den gegebenen Hydrolysebedingungen die gesuchte Sialinsäure zerstört wurde oder daß es sich hier um eine Sialinsäure handelt, die sich den bekannten Nachweismethoden entzieht. Auch der enzymatische Abbau mit Neuraminidase eröffnete keine Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung.

Der prozentuale Anteil der einzelnen Bausteine an dem jeweiligen Polysaccharid ist in Tabelle 3 angegeben. Auffallend ist der niedrige Glykogengehalt in der Mitteldarmdrüse (Midd. 1.1.1.1), der nur ca. 10 % der anthronpositiven Substanzen ausmacht, während er im Herzen 98 % beträgt. Die einzelnen Polysaccharide sind durch eine Vielzahl möglicher Bausteinkombinationen gekennzeichnet, meist sind 5 oder mehr Bausteine in einem Polysaccharid enthalten. Die Verhältnisse der einzelnen Bausteine sind ganzzahlig.

Den Hauptanteil der Neutralzucker stellen Fucose und Galaktose, die in jeder untersuchten Fraktion mit wechselnden Anteilen gefunden wurden. So lassen sich Fucose : Galaktose -Relationen

von 15:1 (Midd. 1.1.4.2) über 1:1 (Midd. 1.3.6.3) bis hin zu 1:4 (Midd. 1.3.4.1) feststellen. Dagegen kommen Glucose und Mannose relativ selten vor. In den glucosehaltigen Polysacchariden beträgt deren Anteil meist nicht mehr als 9 %. Ausnahmen bilden das Polysaccharid Kie. 1.1.1 der Kiemen mit 27 % und das Polysaccharid des Herzens mit 100 % Glucose. Mannose konnte nur bei 5 Polysacchariden (Midd. 1.1.5, Midd. 1.3.3.1, Midd. 1.3.4.1, Midd. 1.3.5.1 und Kie. 1.1.1.1) mit nicht mehr als 4 % nachgewiesen werden.

Den Hauptanteil der geladenen Zucker machen Glucosamin und Galaktosamin aus, die in nahezu allen Fraktionen mit unterschiedlichen Anteilen vertreten sind, während Glucuronsäure und Galakturonsäure zusammen nur in einigen Polysacchariden vorkommen (Midd. 1.3.4.1, Midd. 1.3.4.3, Midd. 1.3.5.1, Midd. 2.1.3, Midd. 2.3.2.1).

Sulfatgruppen treten nur bei einigen Polysacchariden auf (Midd. 1.1.5, Midd. 2.3.3, Midd. 1.3.6.3, Kie. 1.1.1.2 und Kie. 1.1.2).

Ein Vergleich der Polysaccharide der einzelnen Organe ist nur für Herz, Mitteldarmdrüse und Kiemen möglich, da für Schwanzmuskel und Integumentgewebe kein Material vorliegt.

Die drei Polysaccharide der Kiemen unterscheiden sich von denen der Mitteldarmdrüse dadurch, daß sie alle Glucose enthalten (Kie. 1.1.1.1, Kie. 1.1.1.2 und Kie. 1.1.2). Auffallend ist, daß für alle Polysaccharide des $Ba(OH)_2$-Rückstandes Fucose und Galaktose im Verhältnis 1:1 vorkommen (Midd. 2.1.1, Midd. 2.1.3, Midd. 2.1.2 und Midd. 2.3.2.1).

Herz und Mitteldarmdrüse sind die einzigen Organe, in denen ein nur aus Glucose aufgebautes Polysaccharid, also wohl Glykogen, nachgewiesen werden konnte.

3.3 Molekulargewichtsbestimmung

Das Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichtes der reinen Fraktionen mit Hilfe der Gelfiltration an Sepharose 4 B der Firma Pharmacia/Frankfurt erwies sich als nicht anwendbar,

da die Proben vom Gel adsorbiert wurden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß noch Reste der Peptidketten der Polysaccharide vorhanden sind, in denen hauptsächlich die Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin neben Valin, Alanin, Asparagin, Threonin und Serin chromatographisch identifiziert wurden. Versuche, die Adsorption der Polysaccharide durch Erhöhung der Salzkonzentrationen und durch Absättigung des Gels mit Phenylalanin aufzuheben, führten zu keinem Erfolg.

Eine weitere Methode, das Molekulargewicht der Polysaccharide zu bestimmen, indem ihre Diffusionsgeschwindigkeit durch eine Filtrierpapiermembran ermittelt wurde, war zu ungenau, da schon die Werte der Eichdextrane zu stark streuten.

4. Diskussion

4.1 Vergleichende Betrachtung

Vergleicht man die bisherigen Untersuchungen über Polysaccharide mit denen an Orconectes limosus, so scheint letzterer mit seinem äußerst komplexen Polysaccharidspektrum mit mindestens 21 verschiedenen Polysacchariden neben Glykogen und Chitin auf den ersten Blick ein Einzelfall unter den Wirbellosen zu sein.
Wahrscheinlich ist aber der Unterschied zwischen den Literaturdaten an anderen Wirbellosen und den hier vorgelegten Ergebnissen nur methodisch bedingt; mit den bisher verwendeten Methoden war es nicht möglich, alle Polysaccharide eines Tieres bzw. Organs zu erfassen.

Eine vergleichbare Komplexität der Polysaccharide ist im Tierreich nur noch bei den Wirbeltieren nachgewiesen, bei denen neben Glykogen 8 weitere Polysaccharide genau untersucht sind.

Von den Invertebraten stellen die Mollusken hinsichtlich der Polysaccharide die bestuntersuchte Gruppe dar. Dabei wurden jedoch für jeweils eine Art neben Glykogen und Galaktogen nur 1 bis 2 weitere Polysaccharide gefunden (Lash and Whitehouse, 1960[a]; Hunt und

Jevons, 1965; Doyle, 1963; Inoue, 1965 und Meenakshi und Scheer, 1968).

Für Insekten (Estes und Faust, 1967; Lipke et al., 1965[b]; Krishnan, 1965) ebenso wie für Echinodermata (Hunt, 1970) liegen nur einige wenige Arbeiten über Polysaccharide vor, bei denen pro Tier ebenfalls nicht mehr als zwei Polysaccharide gefunden wurden.

Auch bei den wenigen untersuchten Crustaceen wurde neben Glykogen und Chitin nur ein weiteres Polysaccharid identifiziert.

Während Hu (1958) in Polysaccharidhydrolysaten von Hemigrapsus nudus nur die Bausteine Glucose, Galaktose und Fucose nachwies, trennten Meenakshi und Scheer (1959) elektrophoretisch ein saures Mucopolysaccharid derselben Zusammensetzung vom Glykogen ab. Ebenfalls aus Glucose, Galaktose und Fucose besteht das Polysaccharid, welches Munn (1963) in Mitteldarmdrüse, Kiemen und Schwanzmuskel bei Carcinus maenas fand.

Die Identität einzelner Polysaccharide des Flußkrebses mit denen anderer Krebse ist so lange nicht nachweisbar, wie nicht bei beiden eine quantitative Bausteinbestimmung vorliegt.

Hinsichtlich der rein qualitativen Bausteinzusammensetzung lassen sich jedoch Ähnlichkeiten zwischen den Polysacchariden der einzelnen Krebsarten feststellen. So entspricht die bei verschiedenen Krebsarten gefundene Kombination Glucose, Galaktose und Fucose der einiger Polysaccharide von Orconectes limosus (Midd. 1.1.2.1, Midd. 1.1.4.1, Midd. 1.3.1.1).

Darüber hinaus wurden beim Flußkrebs als zusätzliche Bausteine Mannose, Hexuronsäure (Speck, 1967) und Sialinsäure gefunden. Letztere wurde von Warren (1963) in einem Hydrolysat der Mitteldarmdrüse von Homerus americanus identifiziert, jedoch in so geringer Menge, daß er ihre Aufnahme mit der Nahrung nicht ausschloß.

Die beim Flußkrebs vorkommenden Polysaccharidbausteine finden sich sämtlich bei den Polysacchariden der Mollusken wieder. Auch entspricht das Übergewicht an Fucose, Galaktose und Hexosaminen im Gegensatz zu der weniger vorkommenden Glucose den

Verhältnissen bei Orconectes limosus. Die beiden in der Mitteldarmdrüse der Wellhornschnecke (Inoue, 1965) gefundenen Polysaccharide entsprechen in ihrer qualitativen Bausteinzusammensetzung dem Polysaccharid der Mitteldarmdrüse 1.3.3.1 beim Flußkrebs. Darüber hinaus finden sich Ähnlichkeiten in den quantitativen Verhältnissen der Bausteine zueinander. So ergeben sich bei den Polysacchariden beider Tiere gleiche Mannose/Glucose und Glucosamin/Galaktosamin -Verhältnisse.

Das Polysaccharidspektrum der einzelnen Organe beim Orconectes limosus ist unterschiedlich.

Es umfaßt in der Mitteldarmdrüse mindestens 31 Fraktionen im Gegensatz zum Herzen mit nur 5. Da von den 31 Fraktionen nur 19 als elektrophoretisch rein ermittelt werden konnten und somit die restlichen 12 aus jeweils mindestens 2 Fraktionen bestehen müssen, ergibt sich eine geschätzte Gesamtzahl von wenigstens 43 Polysacchariden für die Mitteldarmdrüse, wobei die kleineren Fraktionen der Säulenchromatographie nicht berücksichtigt werden.

Die Polysaccharide der Kiemen wurden nur in einigen Fraktionen vollständig analysiert. Die Untersuchungen des Integumentgewebes und Schwanzmuskels beschränkten sich auf die $Ba(OH)_2$- und Alkoholfällung, mit Ausnahme einer Fraktion des Integuments 1.3, die an der DEAE-Cellulose-Säule chromatographiert wurde. Die für das Integumentgewebe und die Kiemen durchgeführte Fraktionierung mit DEAE-Cellulose ergab, daß sich jeweils 3 ihrer Hauptfraktionen (Intg. 1.3.1 - Kie. 1.3.1, Intg. 1.3.3 - Kie. 1.3.3 und Intg. 1.3.4 - Kie. 1.3.5) gleichen.

Dies kann darin begründet sein, daß es sich bei den Kiemen wie dem Integument um Oberflächengewebe handelt, die sich in Teilen ihres Aufgabenbereiches ähneln. Das Gesamtpolysaccharidspektrum der Kiemen ist jedoch wesentlich komplexer als das des Integumentgewebes.

Vergleicht man das Polysaccharidspektrum des Integumentgewebes mit denen von Mitteldarmdrüse, Kiemen und Schwanzmuskel, so fällt seine geringere Komplexität auf. Der Grund für diese

Abweichung könnte darin liegen, daß im Gegensatz zu den anderen Organen, die ihre Speicherungsmaxima im Untersuchungszeitpunkt hatten, das Integument seinen höchsten Gehalt an Polysacchariden im Februar aufweist. Bei einer entsprechenden Untersuchung an Februartieren ließe sich möglicherweise ein komplexeres Polysaccharidspektrum auch des Integuments nachweisen.

Aus der Tatsache, daß die einzelnen Organe - besonders die Mitteldarmdrüse und das Integumentgewebe - ihre Speicherungsmaxima zu verschiedenen Zeitpunkten erreichen, leitet Urich (1967) die Hypothese ab, daß sich nicht nur die Speicherfunktion von einem auf das andere Gewebe verlagert, sondern daß sogar ein Transport von Kohlenhydraten aus der Mitteldarmdrüse in das Integumentgewebe stattfindet, vermutlich hervorgerufen durch eine Aktivierung des Stoffwechsels im Integument zur Bildung des neuen Panzers.

4.2 Funktionelle Betrachtung

Die Funktionen der Polysaccharide sind vielfältig. Sie können als Reservestoffe für den Energiestoffwechsel, als Strukturbsubstanzen in Binde- und Knorpelgewebe, als Schleimstoffe und als Teile von Glykoproteiden vorkommen.
Das Wissen über die Funktion der Polysaccharide speziell bei den Crustaceen ist so unbefriedigend wie die Kenntnisse über ihren Aufbau. Im allgemeinen wird das Glykogen als Speicherpolysaccharid sowie für die Chitinsynthese als auch für den Energiestoffwechsel angesehen. Meenakshi und Scheer (1959) vermuten, daß das von ihnen gefundene saure Mucopolysaccharid an der Kalkeinlagerung in den Panzer beteiligt ist.

4.2.1 Homoglykane als Speicher und energieliefernde Substanz

Glykogen bildet im allgemeinen den Speicherstoff für den Energiestoffwechsel. Während das Galaktogen bei einigen Molluskenarten eine zusätzliche Speicherfunktion übernehmen kann, wird für die Crustaceen das Glykogen als Polysaccharid des Energie-

stoffwechsels angesehen. Entsprechende Untersuchungen wurden zumeist an Brachyuren durchgeführt, bei denen ein Glykogengehalt von 2-6 % des Mitteldarmdrüsen-Frischgewichtes (Renaud, 1949) ermittelt wurde. Im Vergleich dazu zeichnen sich die untersuchten Flußkrebse durch besondere Armut an Glykogen aus. So wurde für die Mitteldarmdrüse ein Glykogengehalt von 0.02 % des Frischgewichtes gefunden, entsprechend 10 % des Gesamtpolysaccharidgehalts. Dieser äußerst geringe Glykogengehalt könnte einerseits darauf beruhen, daß der Kohlenhydratgehalt der Tiere im Untersuchungszeitpunkt verglichen mit anderen Jahren als niedrig anzusehen ist. Andererseits wäre möglich, daß sich mit den bisher verwendeten Methoden Glykogen nicht quantitativ von den übrigen Polysacchariden trennen läßt, so daß die Glykogenwerte zu niedrig liegen.

Der niedrige Glykogengehalt beim Orconectes limosus im Gegensatz zu Befunden an Brachyuren gibt Anlaß zu der Vermutung, daß Glykogen im Verhältnis zu den Aminosäuren eine untergeordnete Rolle als Energiequelle spielt (Speck und Urich, 1970) Diese These wird unterstützt durch Ergebnisse von Hungerversuchen, wie sie an Hemigrapsus nudus (Neiland und Scheer,1953) und am Flußkrebs (Speck und Urich, 1969) durchgeführt wurden. Neiland und Scheer fanden nach 23 Hungertagen eine signifikante Abnahme zwar für das Protein, nicht aber für das Glykogen und die Lipide. Die Versuche am Flußkrebs ergaben, daß der Energiebedarf in den ersten 15 Hungertagen aus Lipiden und anschließend aus Protein gedeckt wird.

Unter den Organen des Flußkrebses bildet das Herz mit seinem äußerst hohen Glykogengehalt von 6 mg/g Frischgewicht eine Ausnahme. Da das Herz ein Organ mit vorwiegend oxydativem Stoffwechsel und geringer Phosphorylase a-Aktivität ist (Jantzen, 1967), ist die biologische Funktion des Glykogens zwar noch unklar, jedoch könnte man aufgrund seines weitgehenden Abbaus (Speck, 1967) auf eine Bedeutung als Speichersubstanz schließen.

4.2.2 Funktion der Heteropolysaccharide

4.2.2.1 Strukturbestandteile

Heteropolysaccharide wurden bei Wirbeltieren und einigen Wirbellosen als wichtiger Bestandteil des Binde- und Knorpelgewebes identifiziert. Bezüglich ihrer strukturierenden Wirkung geht man davon aus, daß sich durch Verzahnung der Einzelmoleküle untereinander eine makromolekulare Überstruktur bildet, die durch das dreidimensionale Netzwerk der Kollagenfasern mechanisch verfestigt wird. Es ließe sich vermuten, daß Polysaccharide auch beim Flußkrebs als Strukturbestandteile vorkommen, zumal die Polysaccharide während des Jahrescyclus nie vollständig abgebaut werden (Speck, 1967). Dabei sind von den untersuchten Polysacchariden die sulfatierten bevorzugt als Strukturpolysaccharide anzusehen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß sowohl im Bindegewebe von Wirbeltieren (Chondroitinsulfate, Keratosulfate) als auch in knorpelähnlichen Geweben von einigen Invertebraten (Mollusken: Lash und Whitehouse, 1960; Polychaeten: Person und Mathews, 1967) sulfatierte Polysaccharide als Struktursubstanzen dienen.

4.2.2.2 Teile von Glykoproteiden

Da zahlreiche Enzyme, Hormone, Serumproteine, ferner die löslichen Blutgruppensubstanzen und schleimige Sekrete Glykoproteide sind, diese auch regelmäßig als Bausteine biologischer Membranen vorkommen, gilt es, diese von den untersuchten Polysaccharid-Proteinen zu unterscheiden. Neben der Differenzierung mit Hilfe des Molekulargewichtes des Kohlenhydratanteiles besteht die Möglichkeit einer Unterscheidung aufgrund ihrer Bausteinanordnung. Während dem Kohlenhydratanteil der Glykoproteide ein periodischer Aufbau fehlt, weisen die für den Flußkrebs gefundenen Polysaccharide eine Bausteinzusammensetzung von geradzahligen Verhältnissen auf. Das ist als ein Beweis dafür anzusehen, daß es sich nicht um Glykoproteide handelt, sondern daß es freie Polysaccharide oder Mucopolysaccharide sind.

4.2.3 Chitinsynthese

Polysaccharide scheinen bei den Crustaceen an der Chitinsynthese beteiligt zu sein.

Während nach älteren Untersuchungen von Renaud (1949), Schwabe, Scheer und Scheer (1952) und Travis (1955_a) (1957) "Glykogen", das vor der Häutung vermehrt in der Mitteldarmdrüse gespeichert wird, als Ausgangsmaterial der Chitinsynthese dienen soll, wurde bei Metapenaeus (Dall, 1965_b) ein saures Mucopolysaccharid als Ausgangsmaterial identifiziert, welches von Blutamöbocyten transportiert wird (Dall, 1964) und im Häutungsstadium D_3 und A in großer Menge in der Epidermis gefunden wurde (Dall, 1965_a).

Speck und Urich (1971) stellten am Flußkrebs kurz vor der Häutung einen signifikanten Anstieg des Polysaccharidgehaltes fest, der nach der Häutung zur Chitinsynthese weitgehend rückgängig gemacht wird. Diese Polysaccharidmengen stammen offenbar aus dem kurz vor der Häutung resorbierten Chitin und sind im Gegensatz zu denen in anderen Zeitpunkten des Jahrescyclus keine langfristig angelegten Speicher. Vielmehr wird diese Reserve in weniger als 60 Stunden auf- und vollständig wieder abgebaut. Demzufolge müßten Polysaccharide in diesem Zeitraum im Gegensatz zur Hauptspeicherungszeit im Winter (Speck und Urich, 1969) stark erhöhte Einbauraten aufweisen.

Um über die Beteiligung von Polysaccharidspeichern an der Chitinsynthese etwas Bestimmtes aussagen zu können, bedürfte es der Untersuchung, welche Polysaccharide in welchen Organen im Häutungszeitraum signifikant ansteigen.

5. Offene Fragen

Aus den in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungsergebnissen über das Polysaccharidspektrum einzelner Organe des Flußkrebses lassen sich zahlreiche weitere Fragen ableiten.

Dazu wären zunächst weitere analytische Untersuchungen zur Charakterisierung der Polysaccharide nötig. Bedeutsam wäre die Ermittlung der Bausteinverknüpfung und die Anordnung im Raum, sowie die Beantwortung der Frage, welche Aminosäuren des Proteinanteils mit dem Kohlenhydratanteil verbunden sind.

Es gibt keine systematischen Ansatzpunkte, die es gestatten würden, über die Funktionen der einzelnen Polysaccharide Verbindliches auszusagen.
Man könnte aufgrund von Konzentrationsänderungen und Änderungen von Turnoverraten zu Vorstellungen über die Funktion der verschiedenen Polysaccharide kommen. Es wäre zunächst zu untersuchen, wie sich die Mengen der einzelnen Polysaccharide in den Organen jahrescyclisch ändern. Hieraus ließen sich Erkenntnisse darüber gewinnen, welche Rolle die Polysaccharide in den Stoffwechseländerungen aufgrund der Chitinsynthese, Häutung, Fortpflanzung und Winterruhe spielen. Auch müßte man feststellen, wieweit sie an regulatorischen Mechanismen beteiligt sind: z.B. unter osmotischem Stress, unter dem Einfluß spezieller Hormone, beim Hungern und bei der Resorption des alten Integumentgewebes vor der Häutung.

Weiterhin wäre es interessant, die Umsatzraten der Polysaccharide zu analysieren, wenn sich die Tiere in verschiedenen stoffwechselphysiologischen Situationen befinden.

6. Zusammenfassung

Die Polysaccharide einiger Organe des Flußkrebses Orconectes limosus wurden fraktioniert in einem Trennungsgang mit den Schritten: $Ba(OH)_2$-Fällung, fraktionierte Alkoholfällung und chromatographische Trennung an DEAE- und Ecteola-Cellulose. Er wurde vollständig für die Organe Mitteldarmdrüse, Kiemen und Herz durchgeführt, nur der erste und zweite Schritt für Integumentgewebe und Schwanzmuskel.

In der Mitteldarmdrüse wurden mindestens 31 Fraktionen, in den Kiemen 14 und im Herzen 5 nachgewiesen.

An 19 Fraktionen der Mitteldarmdrüse, 3 der Kiemen und 1 des Herzens wurde eine Bausteinanalyse durchgeführt. Die Bausteine wurden qualitativ durch Dünnschichtchromatographie und quantitativ mit Hilfe enzymatischer und chemischer Methoden bestimmt.

Folgende Substanzen sind als Bausteine identifiziert worden: Glucose, Galaktose, Fucose, Mannose, Glucosamin, Galaktosamin, Glucuronsäure, Galakturonsäure und Sialinsäure.
Die einzelnen Polysaccharide sind durch eine Vielzahl möglicher Bausteinkombinationen gekennzeichnet: Meistens sind 5 oder mehr Bausteine an einem Polysaccharid beteiligt, wobei Fucose und Galaktose im Vordergrund stehen. Die Verhältnisse der einzelnen Bausteine sind häufig ganzzahlig.
Sulfatgruppen treten nur bei 5 Polysacchariden auf.

Die untersuchten Organe zeichnen sich mit Ausnahme des Herzens durch Glykogenarmut aus. Außer Glykogen wurden 21 verschiedene Polysaccharide gefunden, wobei man mit Gewißheit davon ausgehen kann, daß mindestens noch einmal die gleiche Anzahl bisher noch nicht isoliert werden konnte.

7. Literaturverzeichnis

Bertolacini, R. and J. Barney (1957): Colorimetric Determination of Sulfate with Barium Chloralinate. Analyt. Chem. 29, 281-283

Brearley, G.M. and J.B. Weiss (1968): A new method for the quantitative determination of monosaccharides, aminosugars and N-acetylneuramin acid and of 6-desoxyhexose (fucose in the presence of other sugars). Biochem. J. 110, 413-417

Dall, W. (1964): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus mastersii (Haswell) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). I. Blood constituents. Austr. J. Mar. Freshwater Res. 15,145-161

Dall, W. (1965[a]): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). III. Composition and structure of the integument. Austr. J. Mar. Freshwater Res. 16, 13-23

Dall, W. (1965[c]): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). IV. Carbohydrate metabolism. Austr. J. Mar. Freshwater Res. 16, 163-180

Doyle, J. (1963): The chemical nature of the mucin secreted by the hypobranchial gland of Neptunea antiqua. Biochem. J. 91, 6 p

Elson, L.A. and W.T.J. Morgan (1933): Biochem. J. 27, 1824 Zit. n. Hoppe-Seyler/Thierfelder (1955)

Estes, Z.E. and R.M. Faust (1967): Studies on the mucopolysaccharides of the greater wax moth Galleria mellonella Limaeus. Comp. Biochem. Physiol. 13, 443-452

Finch, P.R., R. Yuen, H. Schachter and M.A. Moscarello (1969): Enzymic methods for the micro assay of D-mannose, D-glucose, D-galaktose and L-fucose from acid hydrolysates of glycoproteins. Anal. Biochem. 31, 296-305

Günther, H. and A. Schweiger (1968): Zur Identifizierung von Polysacchariden Nachweis der Zuckerbausteine durch Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektroskopie. J. Chromatog. 34, 498-506

Haab, V. und P. Anastassiadis (1961): A Study on the liberation of suguars hexuronic acid and hexosamine from biological material. Can. J. Biochem. 39, 671

Hu, A.S. (1958): Glucose metabolism in the crab Hemigrapsus nudus. Arch. Biochem. Biophys. 75, 387-395

Hunt, S. (eds.) (1970): Polysaccharide-Protein-Complexes in Invertebrates.
Academic Press, London-New York S. 101-118

Hunt, S. and F.R. Jevons (1965): The hypobranchial mucin of whelk Buccinum undatum L.
Biochem. J. 97, 701-709

Inoue, S. (1965): Isolation of new polysaccharide sulphates from Charonia lampas.
Biochem. biophys. Acta 101, 16-36

Jantzen, H. (1967): Die Aktivitäten von Enzymen des Glykogen- und Trehalosestoffwechsels in den einzelnen Organen des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque und Kontrollmechanismen des Glykogenstoffwechsels im Schwanzmuskel.
Diss. Berlin

Krishnan, N. (1965): Occurrence of acid mucopolysaccharide in the cuticle of Scorpion Palamneus Swammerdami.
Current Science 4, 120-121

Lash, J.W. and Whitehouse, M.W. (1960[a]): An unusual polysaccharide in chondroid tissue of the sail Busycon: Polyglucosesulphate.
Biochem. J. 74, 351-355

Laurent, T.C. (1961): Studies on fractionated Heparin.
Arch. Biochem. Biophys. 92, 224

Lipke, H., B. Graves and S. Leto (1965[b]): Polysaccharide and glycoprotein formation in the Cockroach. II. Incorporation of D-glucose C^{14} into bound carbohydrate. J. Biol. Chem. 240, 601-608

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein Measurement with the Folin phenol reagent
J. biol. Chem. 193, 265-275

Meenakshi, V.R. and B.T. Scheer (1959): Acid mucopolysaccharide of the crustaceans cuticule.
Science 130, 1189-1190

Meenakshi, V.R. and B.T. Scheer (1968): Studies on the carbohydrates of the slug Ariolimax columbianis with special reference to their distribution in the reproductive system.
Comp. Biochem. Physiol. 26, 1091-1097

Meier, H. (1958): Barium Hydroxide as a Selective Precipitating Agent for Hemicelluloses.
Acta Chem. Scand. 12, 144-145

Munn, E.A. (1963): The nature and metabolism of the carbohydrates and lipids of Carcinus maenas. Ph. D. Thesis, Southampton

Neiland, K.A. and B.T. Scheer (1953): The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of Hemigrapsus nudus. Physiol. comp. et oecol. 3, 321-336

Neukom, H., H. Deuel, W.J. Heriand, W. Kundig (1960): Chromatographische Fraktionierung von Polysacchariden an Cellulose-Anionenaustauschern. Helv. Chim. Acta 43, 64-71

Orrell, S.A. and E. Bueding (1964): A comparison of products obtained by various procedures used for the extraction of glykogen. J. biol. Chem. 239, 4021-4026

Person, P. and M.B. Mathews (1967): Endoskeletal cartilage in a Marine Polychaete, Eudistylia Polymorpha. Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 132, 244

Renaud, L. (1949): Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Decapodes. Ann. Inst. Océanog. Paris 24, 259-357

Ringertz, N.R. and P. Reichard (1960): Chromatography on Ecteola of sulfate containing mucopolysaccharides. Acta Chem. Scand. 14, 303-311

Roe, J.R. (1955): The determination of sugar in blood an spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212, 335-343

Rybàk, M., Z. Brada und I.M. Hais (eds) (1966): Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern. Jena, VEB Gustav Fischer, 531 D.

Schwabe, W., B.T. Scheer and M.A.R. Scheer (1952): The moult cycle in Palinurus japonicus. Part II of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. Physiol. comp. oecol. 2, 310-320

Speck, U. (1967): Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderungen im Jahresablauf. Diss. Berlin

Speck, U. und K. Urich (1969: Der Abbau körpereigener Substanzen in dem Flußkrebs Orconectes limosus während des Hungerns. Z. vergl. Physiol. 63, 410

Speck, U. und K. Urich (1970): Das Schicksal der Nährstoffe beim Flußkrebs Orconectes limosus.
II. Resorption U-^{14}C-markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe.
Z. vergl. Phys. 68, 318-333

Speck, U. und K. Urich (1971): Quantitative Bedeutung der Reservestoffe für Chitinsynthese, Energiestoffwechsel und osmotische Vorgänge während der Häutung des Flußkrebses Orconectes limosus. Z. vergl. Phys. 71, 286-294

Spencer, B. (1960): The ultramicro estimation of inorganic sulphate. Biochem. J. 75, 435-440

Stahl, E. (1962): Dünnschichtchromatographie. Berlin-Göttingen Heidelberg: Springer Verlag

Stahl, E. (Edit.) (1967): Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch. 1. Aufl. 1962, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Stary, Z. und M. Yuvanidis (1953): Biochem. Z. 324, 206. Zit. n. Hinsberg, K. und Lang, K. (1957)

Travis, F.D. (1955[a]): The molting cycle of the spiny lobster, Palinarus argus Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol. Bull. 108, 88-112

Travis, F.D. (1957): IV. Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and the integumental tissues. Biol. Bull. 113, 451-479

Urich, K. (1967): Biochemische Differenzierung der Organe bei dem Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque. Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschen der Freunde zu Berlin, N.F., Band VII, Jahrgang 1967, S. 71-78

Warren, L. (1963): The distribution of sialic acids in nature. Comp. Biochem. Physiol. 10, 153-169

Werner, J. and L. Odin (1952): Acta Soc. Med. u 57, 230. Zit. n. Hoppe-Seyler/Tierfelder (1955)

Wortmann, B. (1962): Quantitation of keratin sulfate in the presence of other corneal glycosaminoglycans. Anal. Biochem. 4, 10

Ute Herz - Hübner

Lebenslau

Am 3. Februar 1945 wurde ich als Tochter des Gärtnereibesitzers Erich Hübner und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Schmidt, in Berlin-Spandau geboren.
Von 1951 bis 1957 besuchte ich die Grundschule, anschließend den neusprachlichen Zweig der Hans-Carossa-Schule in Spandau, in der ich 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Seit dem Sommersemester 1964 studiere ich an der Freien Universität Berlin Zoologie.

Im Sommer 1967 bestand ich die Diplom-Vorprüfung.

Seit April 1969 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Urich am II. Zoologischen Institut an meiner Dissertation.

Ich bin seit Februar 1969 mit dem Diplomkaufmann Christian Herz verheiratet.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33, Garystr. 45